

09/807933

T/JP 99/05884

4

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

25.10.99

JP99/5884

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月23日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第302387号

出願人
Applicant(s):

明治製菓株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

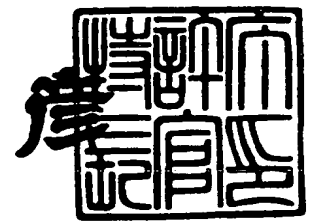


1999年11月26日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3081623

【書類名】 特許願

【整理番号】 11690701

【提出日】 平成10年10月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 9/42

【発明の名称】 エンドグルカナーゼ酵素を含んでなるセルラーゼ調製物

【請求項の数】 32

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社 生物科学研究所内

【氏名】 中 村 裕 子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内

【氏名】 守 屋 達 樹

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内

【氏名】 矢 内 耕 二

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内

【氏名】 隅 田 奈緒美

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社 生物科学研究所内

【氏名】 西 村 智 子

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社 生物科学研究所内

【氏名】 村 島 弘一郎

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社 生物科学研究所内

【氏名】 中 根 公 隆

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区師岡町760 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内

【氏名】 矢 口 貴 志

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社 生物科学研究所内

【氏名】 古 賀 仁一郎

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内

【氏名】 村 上 健

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓株式会社 生物科学研究所内

【氏名】 河 野 敏 明

【特許出願人】

【識別番号】 000006091

【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目4番16号

【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

【代理人】

【識別番号】 100064285

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐 藤 一 雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100067079

【弁理士】

【氏名又は名称】 小 野 寺 捷 洋

【選任した代理人】

【識別番号】 100094640

【弁理士】

【氏名又は名称】 紺 野 昭 男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004444

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 エンドグルカナーゼ酵素を含んでなるセルラーゼ調製物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リゾプス属由来の、下記の特性を有するエンドグルカナーゼ活性を示す酵素。

- a) 平均分子量が約 40 kD である (SDS-PAGE による)
- b) pH 約 4～9 の範囲で活性を有する
- c) 至適温度が 50～65℃ である

【請求項 2】

リゾプス・オリゼー (Rhizopus oryzae) 由来の、請求項 1 記載の酵素。

【請求項 3】

配列番号 1、3、または 5 に記載されるアミノ酸配列を含んでなるエンドグルカナーゼ活性を示す酵素、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそれらの相同体。

【請求項 4】

微生物によって生産され得る、請求項 3 に記載の酵素、その改変タンパク質、またはそれらの相同体。

【請求項 5】

微生物が接合菌類である、請求項 4 に記載の酵素、その改変タンパク質、またはそれらの相同体。

【請求項 6】

微生物がリゾプス属に属する微生物である、請求項 5 に記載の酵素、その改変タンパク質、またはそれらの相同体。

【請求項 7】

微生物がリゾプス・オリゼー (Rhizopus oryzae) に属する微生物である、請求項 6 に記載の酵素、その改変タンパク質、またはそれらの相同体。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれかに記載の酵素、その改変タンパク質、またはそれらの

相同体をコードするDNA配列を含んでなる、DNA構成物。

【請求項9】

配列番号2、4、または6に記載のDNA配列、またはその改変配列を含んでなる、請求項8に記載のDNA構成物。

【請求項10】

アスパラギン結合型(Asn型)糖鎖が付加しないように変異させてなるタンパク質をコードするDNA配列を含んでなる、請求項8または9に記載のDNA構成物。

【請求項11】

宿主において高頻度に使用されるコドンを選択することにより、宿主に対してコドンが最適化されたDNA配列を含んでなる、請求項8～10のいずれか一項に記載のDNA構成物。

【請求項12】

請求項8～11のいずれかに記載されたDNA配列を含んでなる、発現ベクター。

【請求項13】

請求項8～11のいずれかに記載のDNA構成物または請求項12に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項14】

宿主が、酵母または糸状菌である、請求項13に記載の宿主細胞。

【請求項15】

前記酵母が、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属、ハンゼヌラ(*Hansenula*)属またはピキア(*Pichia*)属に属するものである、請求項14に記載の宿主細胞。

【請求項16】

前記酵母が、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)である、請求項15に記載の細胞。

【請求項17】

前記糸状菌が、フミコーラ(*Humicola*)属、アスペルギルス(*Aspergillus*)

属またはトリコデルマ (*Trichoderma*) 属に属するものである、請求項 14 に記載の宿主細胞。

【請求項 18】

前記糸状菌が、フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、またはトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) である、請求項 17 に記載の宿主細胞。

【請求項 19】

請求項 13～18 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養し、その宿主および／またはその培養物から請求項 1～7 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、またはその相同体を採用する工程を含んでなる、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、またはその相同体の製造法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法で生産された、エンドグルカナーゼ酵素。

【請求項 21】

請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、またはその相同体を含んでなる、セルラーゼ調製物。

【請求項 22】

セルロース含有繊維の処理方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

【請求項 23】

セルロース含有繊維が毛羽立ち始める速度を低減するかまたはセルロース含有繊維の毛羽立ちを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

【請求項 24】

セルロース含有繊維の肌触りおよび外観の改善を目的とした減量加工する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物と接触させる工程を含んでなる、方法。

【請求項 25】

着色されたセルロース含有繊維の色の澄明化を行う方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

【請求項 26】

着色されたセルロース含有繊維の色の局所的な変化を提供する方法であって、着色されたセルロース含有繊維を、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

【請求項 27】

セルロース含有繊維がごわ付き始める速度を低減するかまたはセルロース含有繊維がごわ付きを低減する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

【請求項 28】

繊維の処理がその繊維の浸漬、洗濯、またはすすぎを通じて行われる、請求項 22～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物を、飛散性のない顆粒状、安定化された液体状で含有してなる、洗剤添加

物。

【請求項 30】

請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物を含んでなる、洗剤組成物。

【請求項 31】

紙パルプのろ水性の改善方法であって、紙パルプを、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

【請求項 32】

動物飼料の消化能を改善する方法であって、セルロース含有繊維を、請求項 1～7 および 20 のいずれか一項に記載のエンドグルカナーゼ酵素、その改変タンパク質、若しくはその相同体、または請求項 21 に記載のセルラーゼ調製物で処理する工程を含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、エンドグルカナーゼを含んでなるセルラーゼ調製物、およびそのセルラーゼ調製物によるセルロース含有繊維の処理方法に関するものである。

【0002】

背景技術

セルロース含有繊維を、その繊維に所望の特性を与えるためにセルラーゼで処理することが行われている。例えば、繊維業界においては、セルロース含有繊維の肌触りおよび外観を改善するために、あるいは着色されたセルロース含有繊維にその色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」の外観を与えるために、セルラーゼによる処理が行われている（ヨーロッパ特許第307,564号）。

【0003】

また、近年、木材パルプ由来のセルロースを有機溶媒に溶解し、紡糸する再生セルロース系繊維であるテンセル（コートルズ社製）が、その高い強度、吸水度等の性質、さらには環境汚染を起こしにくいその製造法から、注目を集めてきた。しかし、テンセルは製造工程中に毛羽が生じるために、そのままでは繊維としての商品価値は低いものとされている。そこで、製造工程中に生じる毛羽をセルラーゼにより除去する方法が提案されてきた。

【0004】

現在、セルロース含有繊維の処理には主に木材不朽菌であるトリコデルマ（*Trichoderma*）やフミコーラ（*Humicola*）由来のセルラーゼが使用されている。これらセルラーゼは複数のセルラーゼ成分の混合物である。それらの実用化は、セルロース含有繊維に対して所望の効果を奏するには多量のセルラーゼ調製物を使用する必要から生じる困難性によって妨げられてきた。

【0005】

上記のセルラーゼ調製物の短所は、多量のエンドグルカナーゼを含む調製物によって改善されつつある。例えば、エンドグルカナーゼ活性を増強したセルラーゼ調製物は、国際公開第W089/09259号、国際公開第W091/17243号、国際公開第W098/03640号、および国際公開第W094/21801号で公表されている。特に、国際公開第W098/03640号には、フミコーラ由来のエンドグルカナーゼ成分であるNCE4を多量に含むセルラーゼ調製物が、従来の複数のセルラーゼ成分の混合物であるセルラーゼ調製物の5～100倍ものセルロース含有繊維の処理能力を有することが開示されている。しかしながら、再生セルロース系繊維（例えば、テンセル等）に生じる強靱な毛羽を除去するためには、特に高活性なセルラーゼ調製物が必要である。よって、工業的実用化レベルに見合うセルラーゼ調製物を提供するためには、更に高活性のエンドグルカナーゼ成分を含むセルラーゼ調製物を必要とする。

【0006】

一般に、セルロース含有繊維の繊維加工には精練、漂白、染色、シルケット加工等があり、いずれもアルカリ条件下で行われている。しかしながら、上記に示し

たエンドグルカナーゼを多量に含むセルラーゼ調製物にあつては、トリコデルマ由来のものは酸性領域に至適pHを有し、フミコーラ由来のものは中性領域に至適pHを有する。そのため、それらの使用の際には緩衝液の添加等によるpH調整を行い、上記繊維加工とは別工程で行う必要がある。

【0007】

よつて、アルカリ条件下で作用するエンドグルカナーゼ成分があれば、上記繊維加工と同一の工程で処理でき、工程の短縮化が可能となる。その結果、大幅なコストの低減化を可能なものとするこゝが考えられる。

【0008】

一方、リゾプス (Rhizopus) 属由来のセルラーゼがアルカリ条件下において活性を保持し得ることが、特開昭60-226599号、特開昭64-40667号、特開昭64-26779号、特開平7-90300号において開示されている。しかし、これらの開示はいずれも衣類の洗濯すすぎに用いる洗浄剤組成物の提供を目的としたものであり、セルロース含繊維の加工用途には更に高活性なセルラーゼ調製物が必要である。

【0009】

多くの場合、高活性なセルラーゼ調製物は、前述のように、多量なエンドグルカナーゼを含む調製物として提供される。そしてその製造方法としては、国際公開第W091/17243号、国際公開第W098/03667号、および国際公開第W098/111239号において公開されているように、遺伝子組換えの技術を用いて、目的のエンドグルカナーゼ成分を宿主細胞において大量に発現させる方法が知られている。そして、これらの方法において好ましい宿主細胞としては、不完全菌類に属する糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus)、フミコーラ (Humicola)、トリコデルマ (Trichoderma) 等が挙げられている。特に工業レベルでの酵素の生産を考慮した場合、不完全菌類に属するこれらの糸状菌は極めて優良な宿主となる。

【0010】

しかしながら、異種由来の遺伝子を、これらの不完全菌類に属する糸状菌において発現させる際、その塩基配列上の特性が異なる (遺伝子のコドン使用頻度の違ふ) 等の理由で、大量発現が妨げられる場合が多い。特に、接合菌類に属する

リゾプス (Rhizopus) 属由来の遺伝子を、前述の不完全菌類に属する糸状菌において大量に発現させた例はなく、大量発現の技術が求められていたと言える。

【0011】

【発明の概要】

発明者等は、今般、新規な高活性エンドグルカナーゼ酵素およびその遺伝子をリゾプス・オリゼー (Rhizopus oryzae) から単離した。そして、この酵素が種々のセルロース含有繊維の処理に極めて有利に利用できるものであるとの知見を得た。本発明はかかる知見に基づくものである。

従って、本発明は、エンドグルカナーゼ活性を有する酵素およびその遺伝子の提供をその目的としている。

また、本発明は良好な特性を有するセルラーゼ調製物の提供をその目的としている。

さらに本発明は、上記酵素を用いたセルロース含有繊維の処理法の提供をその目的としている。

そして、本発明によるエンドグルカナーゼ活性を有する酵素は、リゾプス属由来の、下記の特性を有するものである。

- a) 平均分子量が約 40 kD である (SDS-PAGE による)
- b) pH 約 4 ~ 9 の範囲で活性を有する
- c) 至適温度が 50 ~ 65℃ である

また、本発明の別の態様によるエンドグルカナーゼ活性を有する酵素は、配列番号 1、3、または 5 に記載されるアミノ酸配列を含んでなるエンドグルカナーゼ活性を示す酵素、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそれらの相同体である。

さらに本発明によるエンドグルカナーゼ活性を有する酵素の遺伝子は、上記の配列番号 1、3、または 5 に記載されるアミノ酸配列を含んでなるエンドグルカナーゼ活性を示す酵素、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードする塩基配列を含んでなるものである。

さらに本発明によるセルラーゼ調製物は、上記の本発明によるエンドグルカナーゼを示す酵素、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、またはそ

これらの相同体を含んでなるものである。

さらにまた、本発明による上記酵素を用いたセルロース含有繊維の処理法は、上記の配列番号 1、3、または 5 に記載されるアミノ酸配列を含んでなるエンドグルカナーゼ活性を示す酵素、エンドグルカナーゼ活性を示すその改変タンパク質、若しくはそれらの相同体、または上記のセルラーゼ調製物とセルロース含有繊維とを接触させる工程を含んでなるものである。

【0012】

【発明の具体的説明】

微生物の寄託

本発明によるリゾプス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*) GP96001株は、FERM P-16201 の受託番号のもと、工業技術院生命工学工業技術研究所に 1997 年 4 月 21 日付けで寄託されている。

【0013】

エンドグルカナーゼ活性を示す酵素

本発明による酵素は、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素、すなわちエンド-1, 4- β -グルカナーゼ EC 3. 2. 1. 4 であり、具体的には β -1, 4-グルカンの β -1, 4-グルコピラノシル結合を加水分解する酵素を意味する。

【0014】

本発明による酵素は、再生セルロース系繊維、特にテンセル等の毛羽除去加工において、従来知られている高活性エンドグルカナーゼに比べ、活性が高く、またアルカリ条件下においても作用する点で有利な性質を有する。本発明による酵素の高い活性は、セルロース含有繊維に所望の作用を提供するのに少量のセルラーゼ調製物が必要とされるにすぎない点で酵素の現実的な使用を可能にする。さらに、アルカリ条件下においても作用する性質は、現在不可能とされているアルカリ条件下での再生セルロース系繊維の毛羽除去加工を可能にする。よって、本発明による酵素によれば、繊維加工の工程を短縮化し、コストの低減化を実用化できるものと考えられる。

【0015】

本発明の第一の態様によれば、リゾプス属由来の、下記の特性を有するエンドグルカナーゼ活性を示す酵素が提供される。

- a) 平均分子量が約 40 kD である (SDS-PAGE による)
- b) pH 約 4～9 の範囲で活性を有する
- c) 至適温度が 50～65℃ である

【0016】

本発明の好ましい態様によれば、上記酵素はリゾプス・オリゼーから得られる。

【0017】

より詳細な酵素の性質は次の通りである。

①作用および基質特異性

本発明による酵素は、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素、すなわちエンド-1, 4-β-グルカナーゼ EC 3. 2. 1. 4 であり、具体的には β-1, 4-グルカンの β-1, 4-グルコピラノシル結合を加水分解するものである。基質としては再生セルロース系繊維、例えばテルセン等に特異的に作用し、極めて低い濃度 (0. 05～0. 5 mg タンパク量/l) でテルセンの羽毛除去を行うことができる。

【0018】

②至適 pH および安定 pH

CMCase 活性での至適 pH は約 5 であるが、約 pH 4～8 において高い活性を有している。また、テルセン羽毛取り活性での至適 pH は約 pH 5 であるが、約 pH 4～9 において高い活性を有している。

【0019】

③至適温度および温度安定性

CMCase 活性での至適温度は約 60℃ であるが、約 50～65℃ において高い活性を有している。また、テルセン羽毛取り活性での至適温度は約 55℃ であるが、約 50～65℃ において高い活性を有している。

【0020】

④分子量

SDS-PAGEによる平均分子量は約40kDaである。

【0021】

本発明の別の態様によれば、エンドグルカナーゼ活性を示す酵素として、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列を含んでなるエンドグルカナーゼ活性を示す酵素が提供される。以下、配列番号1、3、および5に記載されるアミノ酸配列を有する酵素を、それぞれエンドグルカナーゼ RCE I、RCE II、およびRCEIIIと呼ぶ。

【0022】

本発明は、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのみならず、その改変タンパク質も包含するものである。本発明において、改変タンパク質とは、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列において、複数（例えば、1～数個）のアミノ酸の付加、挿入、削減、欠失、または置換などの改変が生じたタンパク質を含んでなるタンパク質であって、依然としてエンドグルカナーゼ活性を保持するものを意味するものとする。

【0023】

さらに、本発明は、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよびその改変タンパク質のみならず、その相同体をも包含するものである。本発明において、相同体とは、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列をコードする遺伝子（塩基配列）と「限定された条件下でハイブリダイズする」遺伝子（塩基配列）によりコードされるアミノ酸配列を有し、かつエンドグルカナーゼ活性を有するポリペプチドを意味する。ここで、「限定された条件下」とは、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列、またはその改変タンパク質のアミノ酸配列、の一部または全部の配列をコードする塩基配列を含んでなるプローブと相同体をコードする遺伝子とがハイブリダイズする一方で、このプローブが、国際公開第W098/03640号に記載のエンドグルカナーゼNCE4遺伝子およびPCT/JP98/02326に記載のエンドグルカナーゼSCE3遺伝子とはハイブリダイズしない程度に制御された条件を意味する（なお、ここで、D

NA量は、NCE4遺伝子、SCE3遺伝子、相同体をコードする遺伝子とも同量使用することとする）。より具体的には、プローブとして標識化した配列番号2に記載のDNA配列の全長を有するものを用い、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング検出システム（アマシャム社製）の方法に従って、1時間のプレハイブリダイゼーション（42℃）の後、前記プローブを添加し、15時間（42℃）ハイブリダイゼーションを行った後、0.4% SDS、6M 尿素添加0.5倍濃度SSC（SSC；15mM クエン酸三ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム）で42℃、20分間の洗浄を2回繰り返し、次に5倍濃度SSCで室温、10分間の洗浄を2回行うような条件が挙げられる。

【0024】

さらに本発明によれば、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードする塩基配列が提供される。タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするDNA配列は容易に定まり、よって、配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードする種々の塩基配列を選択することができる。

【0025】

本発明による塩基配列は、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよく、また、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。本発明による塩基配列の典型的な取得方法としては、リゾプス・オリゼー由来の染色体ライブラリーまたはcDNAライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば、部分アミノ酸配列の情報を基にして作製した適当なDNAプローブを用いてスクリーニングを行う方法などが挙げられる。

【0026】

以下、エンドグルカナーゼ RCE I、RCE II、およびRCEIII並びにそれらの遺伝子をさらに説明する。

【0027】

(1) エンドグルカナーゼ RCE I およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ RCE I は、配列番号1に記載される1～315番のアミノ酸配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タン

パク質のN末端には、更に配列番号1の -23~-1番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ RCE I の改変ペプチドの一種として本発明に包含されるものである。この -23~-1番までのアミノ酸配列は、分泌のためのシグナルペプチドと考えられる。よってその一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果としてN末端に残る配列をも意味するものとする。

【0028】

更に本発明によれば、配列番号1のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号2に記載される塩基配列の一部または全部を有するものである。配列番号2に記載される塩基配列は、1~3番のATGで始まり、1015~1017番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、70~72番の塩基配列は315残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

【0029】

(2) エンドグルカナーゼ RCEII およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ RCEII は、配列番号3に記載される1~343番の配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質のN末端には、更に配列番号1の -23~-1番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ RCEII の改変ペプチドの一種として本発明に含まれるものである。この -23~-1番までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果としてN末端に残る配列をも意味するものとする。

【0030】

更に、本発明によれば、配列番号3のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ RCEII 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号4に記載される塩基配列の一部または全部を有するものである。配列番号4に記載される塩基配

列は、1～3番のATGで始まり、1099～1101番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、70～72番の塩基配列は343残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

【0031】

(3) エンドグルカナーゼ RCEIII およびその遺伝子

本発明によるエンドグルカナーゼ RCEIII は、配列番号5に記載される1～337番の配列を有するエンドグルカナーゼ活性を有する酵素である。上記タンパク質のN末端には、更に配列番号1の -23～-1番までのアミノ酸配列またはその一部が付加されることがあるが、この配列が付加されたポリペプチドはエンドグルカナーゼ RCEII の改変ペプチドの一種として本発明に含まれるものである。この -23～-1番までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果としてN末端に残る配列をも意味するものとする。

【0032】

更に本発明によれば、配列番号5のアミノ酸配列をコードするエンドグルカナーゼ RCEIII 遺伝子が提供される。その典型的配列は、配列番号6に記載される塩基配列の一部または全部を有するものである。配列番号6に記載される塩基配列は、1～3番のATGで始まり、1081～1083番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、70～72番の塩基配列は337残基からなる前記成熟タンパク質のN末端アミノ酸に対応する。

【0033】

発現ベクターおよび形質転換された微生物

本発明においては、前記の本発明による配列番号1、3、または5に記載されるアミノ酸配列、その改変タンパク質、またはそれらの相同体をコードする塩基配列（以下、単に「本発明によるDNA配列」という）を、宿主微生物内で複製可能で、かつ、そのDNA配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。本発現ベクターは、自己複製ベクター、即ち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、

プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

【0034】

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるDNA配列の他に、その発現を制御するDNA配列や微生物を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいるのが望ましい。発現を制御するDNA配列としては、プロモーターおよびターミネーターおよびシグナルペプチドをコードするDNA配列等がこれに含まれる。プロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種もしくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA配列として得ることができる。また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種もしくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導されるDNA配列より得ることができる。また、本発明における遺伝子マーカーは、形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

【0035】

更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌などを用いた系、および、それらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。

【0036】

また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。

【0037】

更に、この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から上記の本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養およびその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同等であってよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

【0038】

また、本発明における好ましい態様によれば、本発明によるDNA配列によってコードされるエンドグルカナーゼ酵素を発現させ得る酵母細胞が提供される。本発明における酵母細胞としては、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、またはピキア (*Pichia*) 属に属する微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

【0039】

更に、本発明によれば、上記の本発明における発現ベクターにより得られた酵母形質転換体が産生するエンドグルカナーゼ酵素が、本発明における好適な用途に使用できる活性を示さなかった場合に、それを改善する方法が提供される。本発明における好適な用途に使用できる活性として、例えば、セルロース含有繊維の毛羽立ちの処理に有意に利用できる活性が挙げられる。酵母細胞において異種タンパク質を発現させた場合、時として、過グリコシル化（過剰な糖鎖の付加）が起きることが Van Arsdell, J.N.ら (Van Arsdell, J.N., 1987, Bio Technology, 5, 60-64) によって報告されている。従って、このような酵母細胞において所望の活性を有するタンパク質を発現させる場合、糖鎖付加に対する制御が必要な場合が生じる。本発明においては、その一例として、アスパラギン結合型 (Asn型) 糖鎖認識部位を有するエンドグルカナーゼ酵素を、それをコードするDNA配列の改変により、Asn型糖鎖が付加しない変異型エンドグルカナーゼ酵素として上記酵母細胞にて発現する方法が提供される。

【0040】

また、上記のように糖鎖付加を制御する場合、例えば、既存の変異処理技術を用いて、糖鎖付加能力を限定した（または、欠失した）宿主酵母細胞を用いることもできる。

【0041】

本発明における上記エンドグルカナーゼ酵素の最も好適な製造方法として、不完全菌類に属する糸状菌における発現方法が提供される。不完全菌類に属する糸状菌において上記エンドグルカナーゼ酵素を発現させる場合、宿主糸状菌のコードン使用に合わせ最適化したDNA配列を用いることが望ましい。本発明において、宿主糸状菌のコードン使用に合わせ最適化したDNA配列は、あるタンパク質をコードするDNA配列を、宿主糸状菌において高頻度で使用されるコードンの情報をもとに置換し、得られる配列を意味する。本発明においては、この最適化したDNA配列を全合成し、発現ベクターに組み込んで宿主糸状菌を形質転換することにより、工業的に好ましい生産量を得ることができる。本発明における宿主糸状菌は、フミコーラ (*Humicola*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属またはトリコデルマ (*Trichoderma*) 属に属するものであることができる。さらにそれらの好ましい例としては、フミコーラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、またはトリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) が挙げられる。

【0042】

セルラーゼの用途／セルラーゼ調製物

本発明の別の態様によれば、上記の本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、その改変ペプチド、または相同体を含んでなるセルラーゼ調製物が提供される。本発明によるセルラーゼ調製物は、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、その改変ペプチド、または相同体を、セルラーゼ調製物に一般的に含まれる成分、例えば賦形剤（例えば、乳糖、塩化ナトリウム、ソルビトール等）、界面活性剤、防腐剤等とともに混合され製造されてよい。また、本発明におけるセルラーゼ調製物はいずれか適当な形状、例えば粉末または液体状に調製することができる。

【0043】

さらに本発明によれば、セルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するか、毛羽立ちを低減するか、肌触りが悪くなる速度を低減するか、またはごわ付きを低減する方法が提供される。この方法は、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素、またはセルラーゼ調製物によりセルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる。

【0044】

更に本発明によれば、着色セルロース含有繊維の澄明化をもたらす方法であって、エンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で着色セルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる方法、ならびに、着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化をもたらす方法、すなわち、着色セルロース含有繊維にストーンウォッシュの外観を与える方法が提供される。そして、この方法は、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物により着色セルロース含有繊維を処理する工程を含んでなる。

【0045】

本発明による上記方法は、洗濯中にセルロース含有繊維を処理することにより実施できる。しかしながら、繊維の処理は、場合によって、ソーキングまたはすすぎ中に、繊維が浸漬されているかまたは浸漬されうる水に、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物を添加することによって実施されてもよい。

【0046】

接触温度、エンドグルカナーゼ酵素の量などの条件は、他の種々の条件を勘案して適宜決定されてよいが、例えばセルロース含有繊維の毛羽立ち始める速度を低減するかまたは毛羽立ちを低減する場合、50~60℃程度の温度で、0.05~1 mg/lのタンパク濃度のエンドグルカナーゼ酵素を使用することにより処理することができる。

【0047】

また、セルロース含有繊維の肌触りおよび外観の改善を目的とした減量加工の場合、50~60℃程度の温度で、5~100 mg/lのタンパク濃度のエンドグルカナー

ゼを使用することにより処理することができる。

【0048】

更に、着色セルロース含有繊維の色の局所的な変化をもたらす場合、50～60℃程度の温度で、2～10 mg/lのタンパク濃度のエンドグルカナーゼを使用することにより処理することができる。

【0049】

また、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物を洗剤組成物中で用いることにより、粒質土壌除去、色彩明澄化、脱毛羽立ち、脱ピリングおよび手粗さ軽減に関し、それらを改善することができる。

【0050】

本発明によれば、紙パルプのろ水性が、強度の著しい低下を伴うことなく、本発明によるエンドグルカナーゼ酵素による処理で有意に改善できることが見出された。したがって、本発明によれば、パルプのろ水性の改善方法であって、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で紙パルプを処理する工程を含んでなる方法が提供される。本発明で処理できるパルプの例としては、古紙パルプ、再循環板紙パルプ、クラフトパルプ、亜硫酸パルプまたは加工熱処理および他の高収率パルプが挙げられる。

【0051】

また、本発明によるエンドグルカナーゼを動物飼料中で用いることにより、飼料中のグルカンの消化能を改善することができる。したがって、本発明によれば、動物飼料の消化能を改善する方法であって、本発明のエンドグルカナーゼ酵素またはセルラーゼ調製物で動物飼料を処理する工程を含んでなる方法が提供される。

【0052】

【実施例】

本発明を以下の実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0053】

エンドグルカナーゼ活性

以下において、エンドグルカナーゼ活性とは、CMCアーゼ活性を意味する。さらに、「CMCアーゼ活性」は、セルラーゼ酵素とカルボキシメチルセルロース（CMC、東京化成工業株式会社製）溶液を一定時間インキュベーション後、遊離してくる還元糖量を測定し、1分間に1 μmol のグルコース相当の還元糖を生成する酵素量を1単位と定義する。

【0054】

実施例A1：リゾプス・オリゼーから40kDのエンドグルカナーゼ酵素の単離精製

リゾプス・オリゼーCP96001株を、培地（6.0% コーンスチープリカー、3.0% 小麦フスマ、1.0% グルコース、0.5% 硫酸マグネシウム、0.15% 炭酸カルシウム）中、28℃で振とう培養した。5日間培養の後、菌体を除去した培養上清液を粗精製セルラーゼ調製液とした。

この粗精製セルラーゼ調製液をマクロブレップメチル HIC担体（バイオラッドラボラトリーズ社製）による疎水クロマトグラフィーに供し、脱イオン水中、硫酸アンモニウム濃度を1.25Mから0.25Mずつのステップワイズ溶離法により溶出して、分画した。このうち、硫酸アンモニウム濃度が0.75Mのときに得られた画分にエンドグルカナーゼ活性が強く認められた。そこでこの画分を再びマクロブレップHIC担体（バイオラッドラボラトリーズ社製）による疎水クロマトグラフィーに供し、脱イオン水中、硫酸アンモニウム濃度を1.25M、1.0M、および0Mのステップワイズ溶離法で溶出して、0M溶出画分を活性画分として回収した。

次に、その画分をSP-セファロース（ファルマシアバイオテク社製）による陽イオンクロマトグラフィーに供し、50mM酢酸緩衝液（pH4.0）中、塩化ナトリウム濃度を0Mから0.1Mずつのステップワイズ溶離法で溶出した。その結果、0.3M溶出画分にエンドグルカナーゼ活性が強く認められた。この画分を精製エンドグルカナーゼ酵素RCE Iとして単離した。このRCE IはSDS-PAGEにおいて単一なバンドを示し、その分子量（MW）は約40kDであった。SDS-PAGEは、NPU-12.5L型パジエル（アトー株式会社製）を使用し、泳動および染色はゲルに添付の製品取扱説明書の方法に従った。分子量スタンダードは、SDS-PAGE分子量スタンダードLowレンジ（バイオラッドラボラトリーズ社製）を使用した。

【0055】

実施例 A 2 : RCE I の再生セルロース系繊維への作用

実施例 A 1 で得られた精製エンドグルカナーゼ酵素 RCE I の、再生セルロース系繊維の代表例であるテンセルの毛羽除去活性を以下のように評価した。

あらかじめ染色されたテンセル（コートルズ社製）生地を界面活性剤およびゴムボールとともに大型ワッシャー中で毛羽立たせた（条件の詳細は下記の通りとした）。その後、形成された毛羽が完全に除去されるのに要するエンドグルカナーゼ酵素のタンパク濃度を算出した。

タンパク濃度はプロテインアッセイキット（バイオラッドラボラトリー社製）を用い、牛血清アルブミンをスタンダードとして定量した。

試験機械：20kgワッシャー（三洋電機株式会社製 全自動洗濯機 SCW5101）

温度：55℃

時間：60分

pH：5（10mM酢酸緩衝液）

6（10mM酢酸緩衝液）

その結果は、下記の第 1 表に示されるとおりであった。

第 1 表

酵素	p H 5	p H 6
R C E 1	0. 0 8 m g / l	0. 0 8 m g / l

【0056】

実施例 A 3 : 各 pH における RCE I の再生セルロース系繊維への作用

あらかじめ染色されたテンセル（コートルズ社製）生地を界面活性剤およびゴムボールとともに大型ワッシャー中で毛羽立たせた（条件の詳細は下記の通りとした）。その後、各 pH において RCE I で毛羽除去処理した。毛羽の除去の程度を、目視観察により評価し、0～5（毛羽除去活性なし～毛羽を完全に除去）に点数化した。

また、対照として、国際公開第 W098/03640 号で開示されているフミコーラ（H

umicola) 由来のエンドグルカナーゼ成分であるNCE4を同様に評価した。

試験機械：20kgワッシャー（三洋電機株式会社製 全自動洗濯機 SCW5101）

温度：55℃

時間：60分

pH：4～6（10mM酢酸緩衝液）

7～9（10mMトリスー塩酸緩衝液）

9～10（10mMグリシンー水酸化ナトリウム緩衝液）

その結果は、図1に示されるとおりであった。図から明らかなように、RCE Iの至適pHは5～7であり、pH4～9の範囲で至適pHにおける活性の70%以上の活性を有していた。一方、対照であるNCE4の至適pHは5であり、pH4～6の範囲で至適pHにおける活性の30%以上の活性を有していた。RCEIがアルカリ条件下において優位に高活性であることがこの結果より明らかである。

【0057】

実施例A4：各pHにおけるRCE Iによるデニム染めセルロース含有繊維の脱色活性の評価

実施例A1で得られた粗精製セルラーゼ調製液と、精製エンドグルカナーゼ酵素RCE Iを用いて、糊抜きした12オンスのブルージーンズパンツを下記の条件で脱色処理をした。

試験機械：20kgワッシャー（三洋電機株式会社製 全自動洗濯機 SCW5101）

温度：55℃

時間：60分

pH：6.2（6.7mMリン酸緩衝液）

処理液には、セルラーゼ調製液とともにゴムボールを適当量加えた。

脱色度を分光測色計（ミノルタ社製 CM-5251）を用い、Lab表示系のL値（明度）を測定した。コントロール（未処理繊維）に対するL値の増加（白色度の増加）＝ ΔL 値を求め、この ΔL 値により脱色の度合いを評価した。すなわち、各試験区につき10点の ΔL 値を測定し（n=10）、その平均値を算出した。そして、 ΔL 値＝7となるのに必要なエンドグルカナーゼのタンパク濃度を算出した。

その結果は、次の第2表に記載の通りであった。

第 2 表

試料	タンパク濃度
粗精製セルラーゼ調製液	80.0 mg / l
RCE I	2.0 mg / l

【0058】

実施例 A 5 : RCE I の各種繊維に対する減量加工試験

あらかじめ絶対乾燥重量を測定してある各種セルロース含有繊維 (15cm×10cm) を下記の条件で酵素処理した。

試験機械：洗濯堅牢度試験機 L-12 (株式会社大栄科学精器製作所)

温度：55℃

時間：60分

pH：6 (10mM酢酸緩衝液)

処理液には、RCE I 調製液 (タンパク濃度 8.0mg/L) とともにステンレスビーズ (株式会社大栄科学精器製作所) を適当量加えた。

酵素処理の前後で布の絶対乾燥重量を測定し、重量減少率を算出した。その結果は、下記の表に示される通りであった。

被験布	減量率 (%)
綿ニット	2.79
麻	1.49
レーヨン	2.83
ポリノジック	11.32
テンセル	3.47

【0059】

実施例 B 1 : RCE I の部分アミノ酸配列

(1) N末端アミノ酸残基の同定

実施例A1において得られた精製したタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定するため、Model 172 μ プレパラティブ HPLCシステム（パーキンエルマ社製）でカラムクロマトグラフィーを行い（カラム：C8 220 \times 2.1mm、0.1%TFA、5%アセトニトリル \sim 0.085%TFA、70%アセトニトリルグラジェント）、目的タンパク質を更に純化した。これをプロテインシーケンサーModel 492（パーキンエルマ社製）に供し、N末端側アミノ酸配列を40残基決定した。得られた配列は以下の通りであった。

N末端アミノ酸配列（配列番号7）：

【化1】

Ala-Glu-(Cys)-Ser-Lys-Leu-Tyr-Gly-Gln-(Cys)-Gly-Gly-Lys-Asn-Trp-Asn-Gly-
* * * * *
 Pro-Thr-(Cys)-(Cys)-Glu-Ser-Gly-Ser-Thr-(Cys)-Lys-Val-Ser-Asn-Asp-Tyr-
 * *
 Tyr-Ser-Gln-(Cys)-Leu-Pro-Ser (40残基)

【0060】

（2）ペプチドマッピング

上記（1）において精製されたタンパク質を凍結乾燥後、50mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に溶解した。タンパク質に対し約1/100モル量のリジルエンドペプチダーゼ（和光純薬社製）を添加し、37 $^{\circ}$ C、48時間反応させた。この分解産物を、前述HPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い（カラム：C18 220 \times 2.1mm、0.1% TFA、5%アセトニトリル \sim 0.085% TFA、35%アセトニトリルグラジェント）、5種のペプチドを分取した。得られたペプチド断片のアミノ酸配列を前述のプロテインシーケンサーにより決定した。その結果は以下に示されるとおりであった。

LE-1：Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Ser-Met-Thr-Tyr-Lys（10残基）（配列番号8）

LE-2: Tyr-Ser-Ala-Val-Ser-Gly-Gly-Ala-Ser-Gly (10残基) (配列番号 9)

LE-3: Ser-Ala-Ser-Asp-(Cys)-Ser-Ser-Leu-Pro-Ser-Ala-Leu-Gln-Ala-Gly-(Cys)-Lys (17残基) (配列番号 10)

LE-4: Tyr-Gly-Gly-Ile-Ser-Ser-Ala-Ser-Asp-(Cys)-Ser-Ser-Leu-Pro-Ser-Ala-Leu-Gln (18残基) (配列番号 11)

LE-5: Arg-Phe-Asn-Trp-Phe-Lys (6残基) (配列番号 12)

* * * * *

【0061】

実施例 B 2 : ゲノムDNAの単離

ゲノムDNAの単離は、以下の様にして行った。

リゾプス・オリゼーを30mlの YPD液体培地 (1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース) で30℃、40時間培養し、遠心分離によって菌体を集菌した。得られた菌体を凍結乾燥し、ブレンダーにて細かく破碎した後、TE (10mMトリス塩酸 (pH 8.0)、1mM EDTA) 緩衝液 8ml に溶解した。これに 10% SDSを含む TE 緩衝液4mlを加え、60℃、30分間保温した。その後、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を12 ml加え、激しく振とうした。遠心後、水層を別の容器に移し、これに1 mlの 5 M酢酸カリウムを加え、氷中に1時間以上放置した。遠心後、水層を別の容器に移し、2.5容のエタノールを加え、DNAを沈殿させた。沈殿を乾燥させた後、5mlの TE緩衝液 に溶解し、10 mg/ml のリボヌクレアーゼA (RNase A) 溶液を5 μl加え、37℃、1時間保温し、更に20 mg/ml プロティナーゼK (proteinase K) 溶液 50 μlを加え、37℃、1時間保温した。その後、3mlのポリエチレングリコール溶液 (20% PEG6000、2.5 M NaCl) を加えて DNA を沈殿させた。沈殿を500 μlのTE緩衝液に溶解し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を2回行い、エタノール沈殿をした。沈殿を70%エタノールで洗浄後、乾燥し、適当量のTE緩衝液に溶解して試料とした。

【0062】

実施例 B 3 : PCR法による長鎖プローブの作製

(1) PCR法による目的 DNA 断片の増幅

DNAプローブとして、リゾプス・オリゼーの全DNAを鋳型にPCR法により増幅したロングプローブを作製した。

各プライマーとして、N末端およびペプチド LE-5の*で示したアミノ酸に対応するDNAを合成した。作製した合成オリゴヌクレオチドの配列は以下に示される通りであった。

Rh-N : AA(AG)AA(CT)TGGAA(CT)GGXCC(AGCT)AC (20mer) (配列番号 13)

Rh-4.3a : TT(AG)AACCA(AG)TT(AG)AA(AGTC)CG (17mer) (配列番号 14)

Rh-4.3b : TT(AG)AACCA(AG)TT(AG)AA(CT)CT (17mer) (配列番号 15)

(X : イノシン)

PCR反応は以下の条件で行った。まず、リゾプス・オリゼーのゲノム DNA 1 μ g に対し、プライマーとして Rh-NおよびRh-4.3a を各1 μ M加えたもの、Rh-NおよびRh-4.3b を各1 μ M加えたものの2組のチューブを作製し、これらを、dNTP存在下、95℃、2分間熱変性を行った。その後、Taqポリメラーゼ（リコンビナントTaq、宝酒造社製）を加え、94℃ 1分間、45℃ 2分間、72℃ 3分間の反応条件を 25 回繰り返した後、72℃で 10分間インキュベートした。このPCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動に供した結果、プライマーとして Rh-NおよびRh-4.3bを用いた場合のみ、約800bpのDNAが増幅していた。

【0063】

(2) PCR産物のサブクローニング

前述約800bpのPCRにて増幅されたDNA断片をセファグラスバンドプレップキット（ファルマシアバイオテク社製）を用いて回収し、これをpT7ブルーTベクター（pT7 Blue T-vector、ノバジェン社製）に、DNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結した。得られた連結混合物で大腸菌 JM109株コンピテントセル（E. coli competent cells JM109、宝酒造社製）を形質転換した。得られた形質転換体を培養した後、Molecular Cloning に記載される方法によりプラスミドDNAを回収した（J.Sambrock, in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed., ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, pp1.25-1.32.）。得られたプラスミドDNAを複数の制限酵素によって切断した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約800bpの断片が挿入されたプラスミドDNA

を選択した。目的のPCR産物がサブクローニングされたプラスミドをpRD05とした。

【0064】

(3) pRD05 の塩基配列の解析

塩基配列解析は以下の様に進めた。

塩基配列解析装置は、A.L.F. DNAシーケンサーII（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。シーケンシングゲルは、ハイドロリンクロングレンジャー（FMC社製）として入手可能なアクリルアミド担体を使用した。ゲル作成用各種試薬（N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン、尿素、および過硫酸アンモニウム）はA.L.Fグレードの試薬（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。塩基配列解読反応は、オートリードシーケンシングキット（ファルマシアバイオテク社製）を用いた。ゲル作製条件、反応条件、および泳動条件の各々は、各説明書の詳細を参照し、設定した。

テンプレートDNA、pRD05をアルカリ変性後、オートリードシーケンシングキット添付のユニバーサルおよびリバーズプライマーとアニーリングさせ、伸長反応を行った。反応産物をシーケンサーで解読したところ、それぞれ約400bpの塩基配列が判明した。これらの結果から、後記するRCE1-01~06 と呼ぶFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pRD05 に対して反応させ、さらに解読を進めた。その結果、pRD05の挿入断片の全塩基配列が解読された。解読された塩基配列はをアミノ酸配列に翻訳したところ、一つの読み枠が、実施例B1において示されたエンドグルカナーゼ RCE I の部分アミノ酸配列の一部と一致した。よってこのプラスミドpRD05に含まれる挿入DNAを以降のスクリーニングのプロープとして用いることとした。

RCE-01: 5'-CAATGTCTTCCCTCTGGAAGCAG-3' (23mer) (配列番号16)

RCE-02: 5'-TGCCCTTAGTGACAGCAATGCCC-3' (23mer) (配列番号17)

RCE-03: 5'-CTTCCTTCCGCACTCCAAGCTGG-3' (23mer) (配列番号18)

RCE-04: 5'-CCAGCTTGGAGTGCGGAAGGAAG-3' (23mer) (配列番号19)

RCE-05: 5'-TCACTAAGGGCAGTGACACCATC-3' (23mer) (配列番号20)

RCE-06: 5'-CAGAGGGAAGACATTGAGAGTAG-3' (23mer) (配列番号21)

【0065】

実施例B4：ゲノムDNAライブラリー（Sau3A I ライブラリー）の作製

リゾプス・オリゼーのゲノムDNAをSau3A Iにより消化し、アガロースLE（ナカライテスク社製）を用いた0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。ゲノムDNAが、9～23kbpの範囲で限定的に分解されたことを確認した後、このDNA断片を定法に従い、抽出、精製した。このDNA断片をファージベクター、Lambda DASH I Iベクター（ストラタジーン社製）に連結した。これをエタノール沈殿後、TE緩衝液に溶解し、この全量をギガパックIIパッケージングキット（ストラタジーン社製）を用いて、ラムダヘッドにパッケージし、得られたファージを大腸菌 XL1-Blue MRA株に感染させた。この方法により得られた 5×10^4 個のファージライブラリーを用いて目的遺伝子のクローニングを行った。

【0066】

実施例B5：RCE I 遺伝子のクローニング

(1) プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニング

まず、実施例B3において得られたプラスミドpRD05を BamH Iで分解した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約800bpのDNA断片を回収した。これをECLダイレクトDNA/RNAラベリング検出システム（アマシャム社製）により標識化した。

次に、実施例B4に従って得られたゲノムDNAライブラリー（Sau3A I ライブラリー）をナイロンメンブラン（ハイボンドN+ナイロントランスファーメンブラン、アマシャム社製）にうつしとり、0.4N水酸化ナトリウムでDNAを固定し、5倍濃度SSC（1×SSC、15mM クエン酸3ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム）で洗浄し、乾燥させDNAを固定した。キットの方法に従って、1時間のプレハイブリダイゼーション（42℃）の後、先の標識化したプローブを添加し、15時間（42℃）ハイブリダイゼーションを行った。ラベルの洗浄は前述キット添付の説明書の方法に従った。まず、0.4% SDS、6M 尿素添加0.5倍濃度SSCで42℃、20分間の洗浄を2回繰り返し、次に2倍濃度SSCで室温、5分間の洗浄を2回行った。プローブの洗浄を行ったナイロン膜を、添付されている検出溶液に1分間浸したあと、フジ

メディカルX線フィルム（富士写真フィルム社製）に感光させ、2個のファージクロンを得た。

【0067】

（2）ファージDNAの調製

大腸菌XL1-Blue MRA株にファージを感染させ、18時間後ファージ粒子を集めた。これら粒子を、Grossbergerの方法（Grossberger, D., Nucleic Acids. Res. 15 6737, 1987）に準じてプロテイナーゼKおよびフェノール処理を行った後、エタノール沈殿により、ファージDNAを分離した。

【0068】

（3）目的遺伝子のサブクロニング

2種のファージDNAを複数の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。DNAをSouthernの方法（Southern, E.M., J.Mol.Biol. 98:503-517, 1975）により、ナイロンメンブランにうつしとり、実施例B5（1）と同様にハイブリダイゼーションした。その結果、2種のファージDNAは、複数の制限酵素の切断によっても共通のハイブリダイゼーションのパターンを示した。また、2種のファージDNAをXba Iで切断した場合に、約3.5 kbp の一本のバンドに共通にハイブリダイズした。このため、このバンドを回収し、プラスミドpUC119のXba I サイトにサブクロニングを行った。得られたプラスミドをpRCE I-Xbaとした。

【0069】

実施例B6：RCE I 遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定を実施例B3（3）と同様の方法により行った。即ち、テンプレートDNAとして実施例B5において得られたプラスミドpRCE I-Xbaを用い、プライマーとしてRCE 01~06の FITC 標識シーケンシングプライマーを用いて反応を行い、解析した。それらの結果より、更に下記のRCE1-07~09と呼ぶFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、各々とプラスミドpRCE I-Xbaを反応させ解析し、エンドグルカナーゼRCE I 遺伝子の全塩基配列を決定した。

RCE-07: 5'-ACAACATTATTTCTTCAAACATG-3' (23mer) (配列番号22)

RCE-08: 5'-AAATGCCGCATCAAGTTTATTG-3' (23mer) (配列番号23)

RCE-09: 5'-TTCATTCTACCTCTGTTGCTGG-3' (23mer) (配列番号24)

【0070】

実施例B7: RCEI遺伝子の発現

(1) RCEI遺伝子への部位特異的変異導入

RCEI遺伝子の開始コドンのすぐ上流および終止コドンのすぐ下流に Bgl II サイトを以下のように部位特異的変異により導入した。

まず、下記の2種の合成オリゴヌクレオチド pIN-BglおよびpIC-Bgl を変異導入用プライマーとして作製し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（和光純薬社製）を用いてそれぞれの 5' 末端を予めリン酸化しておいた。

次に、ミュータジェンM13 インビトロミュータジェネシスキット（Muta-Gene in vitro Mutagenesis Kit、バイオラッドラボラトリー社製）を用いて部位特異的変異導入を行った。即ち、プラスミドpRCEI-Xbaで大腸菌 CJ236 株を形質転換した後、ヘルパーファージ M13 KO7を感染させ、一本鎖DNA (ssDNA) を得た。このpRCEI-Xba ssDNAとリン酸化したプライマー pIN-Bgl、pIC-Bgl をアニーリングさせた後、ポリメラーゼ反応により二本鎖化し、大腸菌JM109株に導入し、変異DNAを得た。この変異導入プラスミドをpRCEI-Bglとした。

pIN-Bgl: 5'-GTAATAAACTTCATAGATCTATGTAAAAAGAATG-3' (34mer) (配列番号25)

pIC-Bgl: 5'-GGATGAGTATAAAAGATCTTATTTTCTTGAAC-3' (32mer) (配列番号26)

【0071】

(2) RCEI遺伝子の酵母における発現

RCEI遺伝子を酵母において発現させるために、国際公開第W097/00757号明細書に記載される宿主ベクター系を用いて、以下の検討を行った。

即ち、実施例B7(1)において得られたプラスミドpRCEI-BglをBglIIで切断し、RCEI遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクターpY2831のBamH I サイト、即ちグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP) プロモーターの下流に作動可能に連結し、プラスミドpYRCEIを得た。このプラスミドにより上記明細書に従って酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MS-161株 (MATa, trp1, ur

a3) を形質転換し、エンドグルカナーゼRCE I が発現可能な形質転換体を得た。

【0072】

実施例 B 8 : 酵母において発現したRCE I の評価

(1) RCE I が発現した酵母の培養

実施例 B 7 において得られたプラスミドpYRCE I による酵母の形質転換体を、50 μ g/ml のウラシルを添加した SD液体培地 (0.67% イーストナイトロジェンベース (ディフコ社製)、2% グルコース) にて、30℃、一晚培養した。この前培養液を終濃度 1%となるように、50 μ g/ml のウラシルおよび1% カザミノ酸を添加したSD液体培地にシードし、30℃、3日間培養した。培養後、遠心分離により酵母菌体を除去し、これを粗酵素液として種々の解析に用いた。

【0073】

(2) SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例 B 8 (1) において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約100~200kDのスメアなバンドとして検出された。

(3) RCE I が発現した酵母の評価 (CMCアーゼ活性)

実施例 B 8 (1) において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、RCE I 遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果は、下記の表に示される通りであった。

	CMCアーゼ (U/ml)
RCE I 遺伝子組み換え株	1.270
コントロール	0.000

(4) RCE I が発現した酵母の評価 (テンセル毛羽除去活性)

実施例 B 8 (1) において得られた粗酵素液を透析した後、実施例 A 3 と同様にpH6におけるテンセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、RCE I 遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培

養液を同様に処理して用いた。

その結果、RCE I 遺伝子組み換え株の500mlブロス/Lによる処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。また、コントロールも同様に、500mlブロス/Lの反応液による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。

【0074】

実施例B9：変異型エンドグルカナーゼRCE I の発現

実施例B8において、酵母で発現させたエンドグルカナーゼ RCE I は、CMCアーゼ活性は示すものの、テンセル毛羽除去活性は示さなかった。また、実施例B8（2）において測定された分子量は、予想される分子量より大きいものであった。

酵母において異種タンパク質を発現させた場合、時として過グリコシル化（過剰な糖鎖の付加）が起きることが Van Arsdelら（ Van Arsdel, J. N., 1987, Bio Technology 5, 60-64 ）によって報告されている。実施例B8におけるエンドグルカナーゼ RCE I を酵母において発現させた場合においても同様の現象がおきていると考えられた。そこで、テンセル毛羽除去活性を示すエンドグルカナーゼRCE I を酵母において発現させるため、アスパラギン結合型（Asn型）糖鎖認識部位のアミノ酸を置換した変異型エンドグルカナーゼRCE I 遺伝子を作成した。

【0075】

（1）RCE I 遺伝子への部位特異的変異導入

Asn型糖鎖の認識部位 Asn-X-Ser/Thrは、酵母および哺乳動物の糖タンパク質において共通であることが、Lehle ら（ Lehle, L., and Bause, E. 1984, Biochim. Biophys. Acta, 799, 246-251 ）によって報告されている。

エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子には、この配列が3カ所あり、配列番号1のアミノ酸配列上のそれぞれ 45番目、90番目、および130番目の位置のアスパラギン残基に糖鎖が結合すると考えられた。Asn型糖鎖の付加されない変異型エンドグルカナーゼRCE I を酵母において発現させるために、RCE I 遺伝子に部位特異的変異導入を行った。

部位特異的変異処理は、実施例B7（1）の方法に従った。即ち、まず、3種

の合成オリゴヌクレオチド 下記のpIRI-S47A、pIRI-S92G、およびpIRI-N130Dを
変異導入用プライマーとして作製し、5' 末端を予めリン酸化した。

次に、プラスミドをpRCE I -Bglで大腸菌CJ236株を形質転換し、ヘルパーファ
ージを用いて ssDNAを得た。このssDNAとプライマーを前述キットを用いてアニ
ーリング、ポリメラーゼ反応により、二本鎖化し、大腸菌 JM109株に導入するこ
とで変異DNAを得た。この変異導入プラスミドを pRCE I -NLCDとした。

pIRI-S47A 5'-CACTTTCAGAAGCTTTATTGCCAC-3' (24mer) (配列番号 27)

pIRI-S92G 5'-GAGCTAGAGCCAGAGTTAGAAG-3' (22mer) (配列番号 28)

pIRI-N130D: 5'-GAGAACTGACATCGGCCTTACC-3' (22mer) (配列番号 29)

【0076】

(2) 変異型エンドグルカナーゼRCE I の酵母における発現

変異型エンドグルカナーゼRCE I 遺伝子の酵母における発現を、実施例 B 7 (2) の方法に準じて行った。即ち、実施例 B 9 (1) において得られたプラスミドpRCE I -NLCD IをBglIIで切断し、変異型セルラーゼRCE I 遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクターpY2831のGAPプロモーターの下流のBamH Iサイトに作動可能に連結し、プラスミドpYI-NLCDを得た。このプラスミドを用いて、酵母 MS-161株を形質転換し、変異型エンドグルカナーゼRCE I が発現した形質転換体を得た。

【0077】

実施例 B 10 : 酵母において発現した変異型エンドグルカナーゼRCE I の評価

(1) 変異型RCE I が発現した酵母の培養

実施例 B 9 において得られたプラスミドpYI-NLCDによる酵母の形質転換体を、実施例 B 8 (1) と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

【0078】

(2) SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例 B 10 (1) において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約40~45kDのスミアなバンドとして検出された。

【0079】

(3) 変異型RCE I が発現した酵母の評価 (CMCアーゼ活性)

実施例 B 10 (1) において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCE I 遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果は、下記の表に示される通りであった。

	CMCアーゼ (U/ml)
変異型RCE I 遺伝子組み換え株	1.100
コントロール	0.000

【0080】

(4) 変異型RCE I が発現した酵母の評価 (テンセル毛羽除去活性)

実施例 B 10 (1) において得られた粗酵素液を透析した後、実施例 A 3 と同様に pH6 におけるテンセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCE I 遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して同様の評価を行った。

その結果、変異型RCE I 遺伝子組み換え株から得られた 150ml プロス/L の反応液で処理を行った場合、完全に毛羽が除去されていた。一方、コントロールの 500ml プロス/L の反応液で処理を行った場合、まったく毛羽除去活性は示されなかった。

この結果から、RCE I を酵母においてテンセル毛羽除去活性を示すように発現させるためには、Asn 型糖鎖認識部位に糖鎖が付加されないようにアミノ酸を置換する必要があることが確かめられた。また、毛羽を完全に除去するのに必要なタンパク質の量を SDS-PAGE 後の染色の程度で測定した。その結果、実施例 A 1 に示した方法により精製したエンドグルカナーゼ RCE I と、酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼ RCE I とでほぼ同等であった。

【0081】

(5) 変異型RCE I が発現した酵母の評価 (各 pH におけるテンセル毛羽除去活

性)

実施例 B 10 (1) において得られた粗酵素液を用いて、実施例 A 3 と同様に pH4~9 におけるテンセル毛羽除去活性を測定した。

変異型 RCE I の至適 pH は 7~8 であり、pH4~9 の範囲で至適 pH における活性の 30% 以上の活性を有していた。酵母で発現させた変異型 RCE I が、リゾプス・オリゼーより精製した RCE I と同様の pH 特性を示すことが明らかとなった。

【0082】

実施例 C 1 : RCE I 遺伝子の相同体遺伝子の検索

リゾプス・オリゼーのゲノム DNA 中のエンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子の相同体遺伝子を検索するために、サザンハイブリダイゼーションによる解析を行った。

まず、実施例 B 2 に従って得られたリゾプス・オリゼーのゲノム DNA 約 10 μ g を複数の制限酵素 (EcoR I、BamH I、Hind III、Sac I、Xba I、Sal I 等) 各々切断し、0.8% アガロースゲル電気泳動に供した。これを実施例 B 5 (3) に従って、メンブランにうつしとり、前述実施例と同一の条件にてハイブリダイゼーションした。その結果、リゾプス・オリゼーのゲノム DNA 上には、エンドグルカナーゼ RCE I 遺伝子の他に少なくとも 2 種類の相同な遺伝子が存在することが明らかになった。RCE I 遺伝子を含め、これら 3 種類の遺伝子は、特にゲノム DNA を Sac I で切断した場合のハイブリダイゼーションにおいて、それぞれ一本のバンドとして検出された。そのため、約 3kbp のバンドとして検出される遺伝子を RCEII、約 10kbp のバンドとして検出される遺伝子を RCEIII として、以降のクローニングを行った。

【0083】

実施例 C 2 : エンドグルカナーゼ RCEII 遺伝子のクローニング

(1) ゲノム DNA ライブラリー (RCEII 遺伝子クローニング用) の作製

リゾプス・オリゼーのゲノム DNA を Sac I により消化し、アガロース LE を用いた 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、約 2~4 kbp の大きさの DNA 断片を定法に従い、抽出、精製した。この DNA 断片をファージベクター、Lambda ZAP II ベクター (ストラタジーン社製) に連結し、実施例 B 4 と同様にパッケージングを行っ

た。得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRF' 株に感染させた。この方法により得られた 1×10^5 個のファージライブラリーを用いてRCEII遺伝子のクローニングを行った。

【0084】

(2) RCEII遺伝子のクローニング

実施例C2(1)で得られたライブラリーと、実施例B3で得られた長鎖プローブを用いて、ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、実施例B5と同様の条件にて行い、3個のファージクローンを得た。

得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRF' 株に感染させ、実施例B5(2)の方法に従ってDNAを調製し、Sac Iで切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した。これを実施例B5(3)の方法に従って、ナイロンメンブランにうつしとり、ハイブリダイゼーションした。その結果、3種のファージDNAにおいて、ゲノムDNAと同一のサイズの共通の約3kbpのバンドが検出された。このバンドを回収し、プラスミドpUC118のSac Iサイトにサブクローニングを行い、得られたプラスミドをpRCEII-Sacとした。

【0085】

実施例C3：エンドグルカナーゼRCEII遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定は、実施例B3(3)と同様に行った。即ち、テンプレートDNAとして実施例C2において得られたプラスミドpRCEII-Sacを用い、プライマーとして実施例B3(3)において作成したRCE 03、04、および05のFITC標識シーケンシングプライマーを用いて反応を行い、解析した。この結果から、新たなFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pRCEII-Sac に対して反応させ、さらに解読を進めた。得られた結果から、さらに次のプライマーを作製して解読を進め、RCEIIの塩基配列を決定した。

RCEII-01: 5'-ACAACATTATTTCTTCGAATATG-3' (23mer) (配列番号30)

RCEII-02: 5'-TTTAGCAGCAGAGGCCATTTTCAG-3' (23mer) (配列番号31)

RCEII-03: 5'-TTTTCTATCCTGATACAGAGATG-3' (23mer) (配列番号32)

RCEII-04: 5'-GCGCTCATAAAACGACTACTACC-3' (23mer) (配列番号33)

RCEII-05: 5'-TGCCCTTAGTGACAGCAATGTCC-3' (23mer) (配列番号 34)

【0086】

実施例 C4 : エンドグルカナーゼ RCEII 遺伝子の発現

(1) RCEII 遺伝子への部位特異的変異導入

RCEII 遺伝子の開始コドンのすぐ上流および終止コドンのすぐ下流に Bgl II サイトを部位特異的変異により導入した。部位特異的変異導入の方法は実施例 B7 (1) に従った。

まず、下記の合成オリゴヌクレオチド pIIC-Bgl を変異導入用プライマーとして新たに作製し、先に実施例 B7 (1) にて合成した pIN-Bgl と共に 5' 末端をリン酸化した。

次に、プラスミド pRCEII-Sac を大腸菌 CJ236 株にて一本鎖化した後、リン酸化したプライマーと反応させ、変異 DNA を得た。この変異導入プラスミドを pRCEII-Bgl とした。

pIIC-Bgl: 5'-CAAGAAAATAAGATCTTTTATACTCCTACT -3' (30mer)

【0087】

(2) RCEII 遺伝子の酵母における発現

RCEII 遺伝子の酵母における発現を実施例 B7 (2) の方法にしたがって行った。即ち、実施例 C4 (1) において得られたプラスミド pRCEII-Bgl を Bgl II で切断し、エンドグルカナーゼ RCEII 遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクター pY2831 の BamH I サイト、即ちグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAP) プロモーターの下流に作動可能に連結し、プラスミド pYRCEII を得た。このプラスミドにより、国際公開第 W097/00757 号明細書に従って、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MS-161 株 (MATa, trp1, ura3) を形質転換し、エンドグルカナーゼ RCEII が発現し得る形質転換体を得た。

【0088】

実施例 C5 : 酵母において発現したエンドグルカナーゼ RCEII の評価

(1) RCEII が発現した酵母の培養

実施例 C4 において得られたプラスミド pYRCEII による酵母の形質転換体を実

施例B8(1)と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

【0089】

(2) SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例C4(1)において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約100~200kDのスミアなバンドとして検出された。

【0090】

(3) RCEIIが発現した酵母の評価(CMCアーゼ活性)

実施例C4(1)において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

	CMCアーゼ (U/ml)
RCEII遺伝子組み換え株	0.260
コントロール	0.000

【0091】

(4) RCEIIが発現した酵母の評価(テンセル毛羽除去活性)

実施例C5(1)において得られた粗酵素液を透析した後、実施例A3と同様にpH6におけるテンセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果、RCEII遺伝子組み換え株の500mlブロス/Lの反応液による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。また、コントロールも同様に、500mlブロス/Lの反応液による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。

【0092】

実施例C6：変異型エンドグルカナーゼRCEIIの発現

実施例C4において、酵母において発現させたエンドグルカナーゼRCEIIはCMCアーゼ活性は示すものの、テンセル毛羽除去活性は示さなかった。また、実施例C4(2)において測定された分子量は、予想される分子量より大きいものであった。これは、RCEIの場合と同様に、アスパラギン結合型(Asn型)糖鎖の過剰付加

によるものと考えられた。そこで、テンセル毛羽除去活性を示すエンドグルカナーゼRCEIIを酵母において発現させるため、Asn型糖鎖認識部位のアミノ酸を置換した変異型エンドグルカナーゼRCEII遺伝子を作成した。

【0093】

(1) RCEII遺伝子への部位特異的変異導入

RCEII遺伝子には、Asn型糖鎖の認識部位 Asn-X-Ser/Thr配列が5カ所あり、配列番号3のアミノ酸配列上のそれぞれ 45番目、92番目、119番目、122番目、および158番目の位置のアスパラギン残基に糖鎖が結合すると考えられた。Asn型糖鎖の付加されない変異型エンドグルカナーゼRCEIIを酵母において発現させるために、RCEII遺伝子に部位特異的変異導入を行った。

部位特異的変異処理は、実施例B7(1)の方法に従って行った。即ち、まず、下記に示す4種の合成オリゴヌクレオチド pIRII S47A、pIRII N92Q、pIRII S121L: N122D、およびpIRII N158Dを変異導入用プライマーとして作製し、5'末端を予めリン酸化した。

次に、プラスミドをpRCEII-Bglで大腸菌CJ236株を形質転換し、ヘルパーファージを用いてssDNAを得た。このssDNAとプライマーを前述キットを用いてアニーリング、ポリメラーゼ反応により、二本鎖化し、大腸菌JM109株に導入することで変異DNAを得た。この変異導入プラスミドをpRCEII-AQLDDとした。

pIRII S47A 5'-AACGGCAATAAGGCCTCTGAATGTAGC-3' (27mer) (配列番号36)

pIRII N92Q 5'-GAAAGCAATGGCCAGAAAACCTTCTGAAAG-3' (29mer) (配列番号37)

pIRII S121L:N122D 5'-GCTTCAAACCTCTCTAGACTCTAGCGGC-3' (27mer) (配列番号38)

pIRII N158D 5'-CGGTAAGGCCGACGTCAGTTCTCC-3' (24mer) (配列番号39)

【0094】

(2) 変異型エンドグルカナーゼRCEIIの酵母における発現

変異型エンドグルカナーゼRCEII遺伝子の酵母における発現は、実施例B7(

2)の方法に従って行った。即ち、実施例C6(1)において得られたプラスミドpRCEII-AQLDD 1をBglIIIで切断し、変異型エンドグルカナーゼRCEII遺伝子を回収した。これをプラスミドベクターpY2831のGAPプロモーターの下流のBamHIサイトに作動可能に連結し、プラスミドpYII-AQLDDを得た。このプラスミドを用いて酵母MS-161株を形質転換し、変異型エンドグルカナーゼRCEIIが発現した形質転換体を得た。

【0095】

実施例C7：酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼRCEIIの評価

(1) 変異型RCEIIが発現した酵母の培養

実施例C6において得られたプラスミドpYII-AQLDDによる酵母の形質転換体を、実施例B8(1)と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

【0096】

(2) SDS-PAGEによる分子量の測定

実施例C7(1)において得られた粗酵素液をSDS-PAGEに供したところ、分子量が約45kDのスミアなバンドとして検出された。

【0097】

(3) 変異型RCEIIが発現した酵母の評価(CMCアーゼ活性)

実施例C7(1)において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

【0098】

	CMCアーゼ (U/ml)
変異型 RCEII遺伝子組み換え株	0.210
コントロール	0.000

【0099】

(4) 変異型RCEIIが発現した酵母の評価(テンセル毛羽除去活性)

実施例C7(1)において得られた粗酵素液を用いて、実施例A3と同様にpH6におけるテンセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして、変異

型RCEII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果、変異型RCEII遺伝子組み換え株の500mlブロス/Lの反応液で処理を行った結果、完全に毛羽が除去されていた。一方、コントロールの500mlブロス/Lの反応液で処理を行ったが、まったく毛羽除去活性を示さなかった。

以上より、RCEIと同様に、RCEIIを酵母においてテンセル毛羽除去活性を示すように発現させるためには、Asn型糖鎖認識部位に糖鎖が付加されないようにアミノ酸を置換する必要があることが確かめられた。また、毛羽を完全に除去するために必要なタンパク質の量をSDS-PAGE後の染色の程度で測定した結果、実施例A1の方法により精製したエンドグルカナーゼRCEIと、酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼRCEIIとにおいてほぼ同等であった。

【0100】

実施例C8：エンドグルカナーゼRCEIII遺伝子のクローニング

(1) ゲノムDNA ライブラリー (RCEIII遺伝子クローニング用) の作製

リゾプス・オリゼーのゲノムDNAをSac Iにより消化し、アガロースLEを用いた0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約10kbpの大きさのDNA断片を定法に従い、抽出し、精製した。このDNA断片を、Lambda DASH IIベクターに連結し、実施例B4と同様にパッケージングを行い、得られたファージを大腸XL1-Blue MRA株に感染させた。この方法により得られた 1×10^5 個のファージライブラリーを用いてRCEIII遺伝子のクローニングを行った。

【0101】

(2) RCEIII遺伝子のクローニング

実施例C8(1)で得られたライブラリーと、実施例B3で得られた長鎖プローブを用いて、ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは、実施例B5と同様の条件にて行い、2個のファージクローンを得た。

得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRA株に感染させ、実施例B5(2)の方法に従ってDNAを調製した。このDNAを複数の制限酵素で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供した後、実施例B5(3)の方法に従って、ナイロンメンブ

ランにうつしとり、ハイブリダイゼーションした。その結果、2種のファージDNAにおいて、ゲノムDNAと同一のサイズの共通のバンドが検出され、特にSac Iの切断により約10kbp、BamH Iの切断により約2 kbpの大きさの一本のバンドを示した。そこで、BamH Iによる切断で得られた約2kbpのバンドを回収し、プラスミドpUC118のBamH Iサイトにサブクローニングを行った。得られたプラスミドをpRCEIII-Bamとした。

【0102】

実施例C9：エンドグルカナーゼRCEIII遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列の決定は、実施例B3(3)と同様に行った。即ち、テンプレートDNAとして実施例C8において得られたプラスミドpRCEIII-Bamを用い、プライマーとして、キット添付のリバースプライマーおよびFITC標識シーケンシングプライマーRCE-06を用いて反応を行って解析した。得られた結果から、新たなFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pRCEIII-Bamに対して反応させ、更に解読を進めた。この手法を更に繰り返すことにより、RCEIIIの塩基配列を決定した。作製したFITC標識シーケンシングプライマーは以下の通りであった。

RCEIII-01: 5'-TACAGGAGCCAACAGGGGAGGTG-3' (23mer) (配列番号40)
 RCEIII-02: 5'-TTCACAGCAGGTAGGTCCATTCC-3' (23mer) (配列番号41)
 RCEIII-03: 5'-CCTACGGTTTCGCCGCTGCTTCC-3' (23mer) (配列番号42)
 RCEIII-04: 5'-TAGATACCAACACCACCACCGGG-3' (23mer) (配列番号43)
 RCEIII-05: 5'-TGAAGTTCCTTACCATTGCCTCC-3' (23mer) (配列番号44)
 RCEIII-06: 5'-TGGTGAAACCACTCGCTACTGGG-3' (23mer) (配列番号45)
 RCEIII-07: 5'-TTCTGCCTCTGACTGTTCTAACC-3' (23mer) (配列番号46)
 RCEIII-08: 5'-AATAGAGTTACTCTATACGATAG-3' (23mer) (配列番号47)
 RCEIII-09: 5'-CACCACCAGAGACAGCGGAGTAG-3' (23mer) (配列番号48)
 RCEIII-10: 5'TGCGTTGATTATCCTGACAATCC--3' (23mer) (配列番号49)

【0103】

実施例C10：エンドグルカナーゼRCEIII遺伝子の発現

(1) RCEIII遺伝子への部位特異的変異導入

RCEIII遺伝子の開始コドンのすぐ上流および終止コドンのすぐ下流にBamH Iサイトを以下のようにPCR法により導入した。まず、下記に示される合成オリゴヌクレオチド pIIIC-Bam 1およびpIIIC-Bam 2を変異導入用プライマーとして新たに作製した。先に実施例C 8において得られたプラスミドpRCEIII-Bamをテンプレートとして、pIIIC-Bam 1およびpIIIC-Bam 2を用いてPCRを行い、変異DNAを得た。この変異DNAをBamH Iにより切断し、得られたDNA断片を回収し、プラスミド pUC118のBamH Iサイトにサブクローニングを行った。得られた変異導入プラスミドをpRCEIII-Bam 2とした。

pIIIC-Bam 1: 5'-GCGGATCCATGAAGTTCCTTACCATTGCC -3' (29mer) (配列番号 50)

pIIIC-Bam 2: 5'-GCGGATCCTTATTTTCTTGAACAGCCAGA -3' (29mer) (配列番号 51)

RCEIII遺伝子には、Asn型糖鎖の認識部位 Asn-X-Ser/Thr配列が4カ所あり、配列番号5のアミノ酸配列上のそれぞれ 44番目、49番目、121番目、および171番目の位置のアスパラギン残基に糖鎖が結合すると考えられた。RCE Iおよび RCEIIと同様に、酵母においてテンセル毛羽除去活性を示すように発現させるために、44番目と121番目のAsn型糖鎖認識部位に糖鎖が付加されないようにアミノ酸を置換する必要があることが確かめられたため、RCEIII遺伝子に部位特異的変異導入を行った。

部位特異的変異処理は実施例B 7 (1)の方法に従って行った。即ち、まず、下記に示す2種の合成オリゴヌクレオチドpIRIII N44D、およびpIRIII N121Kを変異導入用プライマーとして作製し、5'末端を予めリン酸化した。次に、プラスミドをpRCEIII-Bam 2で大腸菌CJ236株を形質転換し、ヘルパーファージを用いて ssDNA を得た。このssDNAとプライマーを前述キットを用いてアニーリング、ポリメラーゼ反応により、二本鎖化し、大腸菌JM109株に導入することで変異DNAを得た。この変異導入プラスミドを pRCEIII-DKとした。

pIRIII N44D : 5'-GTGGAGGTGAGATCTTCATTGGGAAC-3' (26mer) (配列番号 52)

pIRIII N121K 5'-CAGCGGAGTACTTTGTAGAAGCAG-3' (24mer) (配列番号 53)

号53)

【0104】

(2) 変異型エンドグルカナーゼRCEIIIの酵母における発現

変異型RCEIII遺伝子の酵母における発現を実施例B7(2)の方法に従って行った。即ち、上記(1)において得られたプラスミドpRCEIII-DKをBamH Iで切断し、変異型RCEIII遺伝子を回収した。これを、プラスミドベクターpYIII-DKのGAPプロモーターの下流のBamH Iサイトに作動可能に連結し、プラスミドpYIII-DKを得た。このプラスミドを用いて酵母MS-161株を形質転換し、変異型エンドグルカナーゼRCEIIIが発現した形質転換体を得た。

【0105】

実施例C11：酵母において発現した変異型エンドグルカナーゼRCEIIIの評価

(1) 変異型RCEIIIが発現した酵母の培養

実施例C10において得られたプラスミドpYIII-DKによる酵母の形質転換体を、実施例B8(1)と同一の条件にて培養し、上清を粗酵素液とした。

【0106】

(2) 変異型RCEIIIが発現した酵母の評価(CMCアーゼ活性)

実施例C11(1)において得られた粗酵素液を用いて、CMCアーゼ活性を測定した。また、コントロールとして、変異型RCEIII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

	CMCアーゼ (U/ml)
変異型RCEIII遺伝子組み換え株	0.472
コントロール	0.000

【0107】

(3) 変異型RCEIIIが発現した酵母の評価(テンセル毛羽除去活性)

実施例C11(1)において得られた粗酵素液を透析した後、実施例A3と同様にpH6におけるテンセル毛羽除去活性を測定した。また、コントロールとして

、変異型RCEIII遺伝子が導入されていないベクターDNAのみによって形質転換された株の培養液を同様に処理して用いた。

その結果、変異型RCEIII遺伝子組み換え株の300mlブロス/Lの反応液による処理により完全に毛羽が除去された。一方、コントロールの500mlブロス/Lの反応液による処理は、まったく毛羽除去活性を示さなかった。

また、毛羽を完全に除去するのに必要なタンパク質の量をSDS-PAGE後の染色の程度で測定した。その結果、実施例A1で示した方法で精製したエンドグルカナーゼRCEIと、酵母で発現させた変異型エンドグルカナーゼRCEIIIとではほぼ同等であった。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> Endoglucanase and cellulase composition containing the same

<130> 11690701

<140>

<141> 1998-10-

<160> 55

<170>

<210> 1

<211> 328

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-20)...(-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)...(315)

Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Val Thr Asn
 205 210 215
 Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln
 220 225 230
 Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln Trp
 235 240 245
 Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser
 250 255 260 265
 Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys
 270 275 280
 Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr
 285 290 295
 Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser
 300 305 310
 Arg Lys
 315

<210> 2

<211> 1017

<212> DNA

<213> Rhizopus oryzae CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(69)

<221> mat_peptide

<222> (70)...(1017)

<400> 2

atg aag ttt att act att gcc tct tcc gct ctc ttg gct ctc gcc ctc	48
Met Lys Phe Ile Thr Ile Ala Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu	
-20 -15 -10	
ggt act gaa atg gcc tct gct gct gaa tgt agc aaa ttg tat ggt caa	96
Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln	
-5 1 5	
tgt ggt ggt aag aac tgg aat ggc cct act tgt tgt gaa tct gga tcc	144
Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser	
10 15 20 25	
acc tgt aaa gta agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt ccc tct gga	192
Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ser Gly	
30 35 40	
agc agt ggc aat aaa tct tct gaa agt gct cac aag aag act acc act	240
Ser Ser Gly Asn Lys Ser Ser Glu Ser Ala His Lys Lys Thr Thr Thr	
45 50 55	
gct gct cac aag aag act act acc gct gct cat aaa aag act acc act	288
Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr Ala Ala His Lys Lys Thr Thr Thr	
60 65 70	
gct cct gct aag aag act aca act gtt gcc aaa gct tcc acc cct tct	336
Ala Pro Ala Lys Lys Thr Thr Thr Val Ala Lys Ala Ser Thr Pro Ser	
75 80 85	
aac tct agc tct agc tcc agc ggc aaa tat tcc gct gtc tct ggt ggt	384
Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly	
90 95 100 105	
gcc tct ggt aac ggt gtc act act cgt tat tgg gat tgc tgt aag gcc	432
Ala Ser Gly Asn Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala	
110 115 120	

tcc tgt agc tgg ccc ggt aag gcc aat gtc agt tct cct gtc aag tcc	480
Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser	
125 130 135	
tgt aac aaa gat ggt gtc act gcc ctt agt gac agc aat gcc caa agt	528
Cys Asn Lys Asp Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Ala Gln Ser	
140 145 150	
ggc tgt aac ggt ggt aac agt tac atg tgt aac gac aac caa cct tgg	576
Gly Cys Asn Gly Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp	
155 160 165	
gct gta aac gac aac ctt gcc tat ggt ttc gct gct gct gcc atc agt	624
Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser	
170 175 180 185	
ggc ggt ggt gaa tct cgc tgg tgc tgt tct tgt ttc gaa ctt act ttc	672
Gly Gly Gly Glu Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe	
190 195 200	
act tct acc tct gtt gct ggt aag aag atg gtt gtc caa gtc act aac	720
Thr Ser Thr Ser Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln Val Thr Asn	
205 210 215	
act ggt ggt gat ctt ggc tcc tct act ggt gct cac ttt gac ttg caa	768
Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln	
220 225 230	
atg ccc ggt ggt ggt gtt ggt att ttc aat ggt tgt tcc agc caa tgg	816
Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Ser Gln Trp	
235 240 245	
ggc gct ccc aat gac ggt tgg ggc tca aga tac ggt ggt att tct tct	864
Gly Ala Pro Asn Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser	
250 255 260 265	

gca tct gac tgc tct agt ctt cct tcc gca ctc caa gct ggt tgt aaa 912
 Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys
 270 275 280
 tgg aga ttc aac tgg ttc aag aac gct gat aac cca agc atg act tac 960
 Trp Arg Phe Asn Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr
 285 290 295
 aag gaa gtt acc tgt cct aag gaa atc acc gcc aag aca ggt tgt tca 1008
 Lys Glu Val Thr Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser
 300 305 310
 aga aaa taa 1017
 Arg Lys
 315

<210> 3

<211> 366

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-23)...(-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)...(343)

<400> 3

Met Lys Phe Ile Thr Ile Thr Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu
 -20 -15 -10
 Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Lys Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln
 -5 1 5

Cys Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser			
10	15	20	25
Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu			
	30	35	40
Ser Asn Gly Asn Lys Ser Ser Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys			
	45	50	55
Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr			
	60	65	70
Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu Ser			
	75	80	85
Asn Gly Asn Lys Thr Ser Glu Ser Ala His Lys Thr Thr Thr Thr Thr			
	90	95	100
Ala Pro Ala Lys Glu Ile Thr Thr Thr Ala Lys Ala Ser Asn Ser Ser			
	110	115	120
Asn Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ile Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn			
	125	130	135
Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp			
	140	145	150
Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp			
	155	160	165
Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly			
	170	175	180
Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp			
	190	195	200
Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu			
	205	210	215
Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser			
	220	225	230

Val Ala Gly Lys Lys Met Val Ile Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp
 235 240 245
 Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly
 250 255 260 265
 Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Gly Ala Pro Asn
 270 275 280
 Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys
 285 290 295
 Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn
 300 305 310
 Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr
 315 320 325
 Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser Arg Lys
 330 335 340

<210> 4

<211> 1101

<212> DNA

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(69)

<221> mat_peptide

<222> (70)...(1101)

<400> 4

atg aag ttt att act att acc tct tcc gct ctc ttg gct ctc gcc ctt	48
Met Lys Phe Ile Thr Ile Thr Ser Ser Ala Leu Leu Ala Leu Ala Leu	
-20 -15 -10	
ggt act gaa atg gcc tct gct gct aaa tgt agc aag ctg tat ggt caa	96
Gly Thr Glu Met Ala Ser Ala Ala Lys Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln	
-5 1 5	
tgt ggt ggt aag gac tgg aat ggc cct act tgt tgc gaa tct gga tcc	144
Cys Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser	
10 15 20 25	
acc tgt aaa gta agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt gcc cct gaa	192
Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu	
30 35 40	
agc aac ggc aat aag tct tct gaa tgt agc aag ttg tat ggt caa tgt	240
Ser Asn Gly Asn Lys Ser Ser Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys	
45 50 55	
ggt ggt aag gac tgg aat ggc cct act tgt tgc gaa tct gga tcc acc	288
Gly Gly Lys Asp Trp Asn Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr	
60 65 70	
tgt aaa gta agc aac gat tac tac tct caa tgt ctt gcc cct gaa agc	336
Cys Lys Val Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Ala Pro Glu Ser	
75 80 85	
aat ggc aat aaa act tct gaa agc gct cat aaa acg act act acc act	384
Asn Gly Asn Lys Thr Ser Glu Ser Ala His Lys Thr Thr Thr Thr Thr	
90 95 100 105	
gct ccc gct aag gaa att aca act act gcc aaa gct tca aac tct tct	432
Ala Pro Ala Lys Glu Ile Thr Thr Thr Ala Lys Ala Ser Asn Ser Ser	
110 115 120	

aac tct agc ggc aaa tac tcc att gtc tct ggt ggt gcc tct ggt aac	480
Asn Ser Ser Gly Lys Tyr Ser Ile Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn	
125 130 135	
ggg gtc act act cgt tat tgg gat tgc tgt aag gcc tcc tgt agc tgg	528
Gly Val Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Ala Ser Cys Ser Trp	
140 145 150	
ccc ggt aag gcc aat gtc agt tct cct gtc aag tcc tgt aac aaa gat	576
Pro Gly Lys Ala Asn Val Ser Ser Pro Val Lys Ser Cys Asn Lys Asp	
155 160 165	
ggg gtc act gcc ctt agt gac agc aat gtc caa agt ggc tgt aac ggt	624
Gly Val Thr Ala Leu Ser Asp Ser Asn Val Gln Ser Gly Cys Asn Gly	
170 175 180 185	
ggg aac agt tac atg tgt aac gac aac cag cct tgg gct gta aac gat	672
Gly Asn Ser Tyr Met Cys Asn Asp Asn Gln Pro Trp Ala Val Asn Asp	
190 195 200	
aat ctt gcc tat ggt ttc gct gct gct gcc atc agt ggt ggt ggt gaa	720
Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Glu	
205 210 215	
tct cgc tgg tgc tgt tct tgt ttc gaa ctt act ttc act tct acc tct	768
Ser Arg Trp Cys Cys Ser Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ser	
220 225 230	
gtt gct ggt aag aag atg gtt atc caa gtc act aac act ggt ggt gat	816
Val Ala Gly Lys Lys Met Val Ile Gln Val Thr Asn Thr Gly Gly Asp	
235 240 245	
ctt ggc tcc tct act ggt gct cac ttt gac ttg caa atg ccc ggt ggt	864
Leu Gly Ser Ser Thr Gly Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly	
250 255 260 265	

ggt gtt ggt att ttc aat ggt tgc tcc aag caa tgg ggt gct ccc aat 912
 Gly Val Gly Ile Phe Asn Gly Cys Ser Lys Gln Trp Gly Ala Pro Asn
 270 275 280
 gac ggt tgg ggc tcg aga tac ggt ggt att tct tct gca tct gac tgc 960
 Asp Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys
 285 290 295
 tct agt ctt cct tcc gca ctc caa gct ggt tgt aaa tgg aga ttc aac 1008
 Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Asn
 300 305 310
 tgg ttc aag aac gct gat aac cca agc atg act tac aag gaa gtt acc 1056
 Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys Glu Val Thr
 315 320 325
 tgt ccc aag gaa atc acc gcc aag aca ggt tgt tca aga aaa taa 1101
 Cys Pro Lys Glu Ile Thr Ala Lys Thr Gly Cys Ser Arg Lys
 330 335 340

<210> 5

<211> 360

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (-23)...(-1)

<221> mat_peptide

<222> (1)...(337)

<400> 5

Met	Lys	Phe	Leu	Thr	Ile	Ala	Ser	Ser	Ala	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Val
			-20				-15				-10				
Gly	Thr	Glu	Met	Ala	His	Ala	Ala	Glu	Cys	Ser	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Gln
		-5					1				5				
Cys	Gly	Gly	Lys	Asn	Trp	Asp	Gly	Pro	Thr	Cys	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser
10				15					20					25	
Thr	Cys	Val	Asp	Tyr	Pro	Asp	Asn	Pro	Phe	Tyr	Ser	Gln	Cys	Val	Pro
			30					35					40		
Asn	Glu	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Asn	Lys	Ser	Ser	His	Lys	Thr	Thr	Thr
			45					50					55		
Thr	Glu	Ser	Ala	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Ser	Lys	Lys	Thr
		60					65					70			
Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Ser	Lys
		75				80					85				
Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Ser	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys
90					95					100				105	
Lys	Ala	Ser	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn
			110						115				120		
Tyr	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Asn	Gly	Glu	Thr	Thr	Arg
		125						130					135		
Tyr	Trp	Asp	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser	Cys	Ser	Trp	Pro	Gly	Lys	Ala	Asp
		140						145					150		
Val	Thr	Ser	Pro	Val	Gly	Ser	Cys	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	Thr	Leu	Ala
		155					160					165			
Asp	Asn	Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Cys	Val	Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Thr	Cys
170				175						180				185	
Asn	Asp	Asn	Gln	Pro	Trp	Val	Val	Ser	Asp	Asp	Leu	Ala	Tyr	Gly	Phe
			190						195					200	

Ala Ala Ala Ser Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala Thr Trp Cys Cys Ala
 205 210 215
 Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ala Val Lys Gly Lys Lys Met
 220 225 230
 Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Ser Asp Leu Gly Ser Asn Thr Gly
 235 240 245
 Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Tyr Asn
 250 255 260 265
 Gly Cys Ala Thr Gln Trp Gly Ala Pro Thr Asp Gly Trp Gly Ala Arg
 270 275 280
 Tyr Gly Gly Val Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Asn Leu Pro Ser Ala
 285 290 295
 Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn Ala Asp
 300 305 310
 Asn Pro Thr Met Thr Tyr Lys Gln Val Thr Cys Pro Lys Ala Ile Thr
 315 320 325
 Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg Lys
 330 335

<210> 6

<211> 1083

<212> DNA

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(69)

<221> mat_peptide

<222> (70)...(1083)

<400> 6

atg aag ttc ctt acc att gcc tcc tcc gct atc ttg gca ctt gcc gtc	48
Met Lys Phe Leu Thr Ile Ala Ser Ser Ala Ile Leu Ala Leu Ala Val	
-20 -15 -10	
ggc act gaa atg gcc cat gct gct gaa tgt agc aag gct tac tac caa	96
Gly Thr Glu Met Ala His Ala Ala Glu Cys Ser Lys Ala Tyr Tyr Gln	
-5 1 5	
tgt ggt ggt aag aac tgg gat gga cct acc tgc tgt gaa tct ggc tct	144
Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asp Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser	
10 15 20 25	
act tgc gtt gat tat cct gac aat cct ttc tac tcc caa tgt gtt ccc	192
Thr Cys Val Asp Tyr Pro Asp Asn Pro Phe Tyr Ser Gln Cys Val Pro	
30 35 40	
aat gaa aac ctc acc tcc act aac aaa tct tct cac aaa acc acc act	240
Asn Glu Asn Leu Thr Ser Thr Asn Lys Ser Ser His Lys Thr Thr Thr	
45 50 55	
act gag agt gcc aag aag act acc act act aaa ggt tcc aag aag acc	288
Thr Glu Ser Ala Lys Lys Thr Thr Thr Thr Lys Gly Ser Lys Lys Thr	
60 65 70	
acc act act gaa gcc tct aag aag acc acc act act gaa gct tcc aag	336
Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys	
75 80 85	
aag acc acc act act gaa gcc tct aag aag acc acc act act act aag	384
Lys Thr Thr Thr Thr Glu Ala Ser Lys Lys Thr Thr Thr Thr Thr Lys	
90 95 100 105	
aag gct tct acc tcc act tcc tct tcc tct tct tct gct tct aca aac	432
Lys Ala Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ser Thr Asn	
110 115 120	

tac tcc gct gtc tct ggt ggt gcc tcc ggt aat ggt gaa acc act cgc	480
Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly Asn Gly Glu Thr Thr Arg	
125 130 135	
tac tgg gat tgt tgt aag cct tct tgc agt tgg ccc ggt aag gct gat	528
Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro Ser Cys Ser Trp Pro Gly Lys Ala Asp	
140 145 150	
gtc acc tcc cct gtt ggc tcc tgt aac aag gat ggt aag act ctt gct	576
Val Thr Ser Pro Val Gly Ser Cys Asn Lys Asp Gly Lys Thr Leu Ala	
155 160 165	
gat aac aac act caa aac ggc tgt gtt ggt ggt agc agc tac acc tgt	624
Asp Asn Asn Thr Gln Asn Gly Cys Val Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Cys	
170 175 180 185	
aat gac aat caa cct tgg gtt gtt agc gac gac ctt gcc tac ggt ttc	672
Asn Asp Asn Gln Pro Trp Val Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Phe	
190 195 200	
gcc gct gct tcc att tct ggt ggt agc gaa gct act tgg tgt tgt gcc	720
Ala Ala Ala Ser Ile Ser Gly Gly Ser Glu Ala Thr Trp Cys Cys Ala	
205 210 215	
tgt ttc gaa ctc aca ttc acc tct act gcc gtc aag ggt aag aag atg	768
Cys Phe Glu Leu Thr Phe Thr Ser Thr Ala Val Lys Gly Lys Lys Met	
220 225 230	
gtt gtt caa gta acc aac act ggt tct gac ctt ggc tct aac act ggt	816
Val Val Gln Val Thr Asn Thr Gly Ser Asp Leu Gly Ser Asn Thr Gly	
235 240 245	
gct cac ttt gac ttg caa atg ccc ggt ggt ggt gtt ggt atc tac aat	864
Ala His Phe Asp Leu Gln Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Tyr Asn	
250 255 260 265	

ggt tgt gcc act caa tgg ggt gct ccc acc gat ggt tgg ggt gca aga 912
Gly Cys Ala Thr Gln Trp Gly Ala Pro Thr Asp Gly Trp Gly Ala Arg

270 275 280

tac ggc ggt gtt tct tct gcc tct gac tgt tct aac ctt cct tct gcc 960
Tyr Gly Gly Val Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Asn Leu Pro Ser Ala

285 290 295

ctt caa gct ggt tgt aag tgg aga ttc ggc tgg ttc aaa aac gct gat 1008
Leu Gln Ala Gly Cys Lys Trp Arg Phe Gly Trp Phe Lys Asn Ala Asp

300 305 310

aac cca acc atg acc tac aaa caa gtt acc tgt ccc aag gct atc act 1056
Asn Pro Thr Met Thr Tyr Lys Gln Val Thr Cys Pro Lys Ala Ile Thr

315 320 325

gcc aag tct ggc tgt tca aga aaa taa 1083
Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg Lys

330 335

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 5

Ala Glu Cys Ser Lys Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Lys Asn Trp Asn

1 5 10 15

Gly Pro Thr Cys Cys Glu Ser Gly Ser Thr Cys Lys Val Ser Asn Asp

20 25 30

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Ser

35 40

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 8

Asn Ala Asp Asn Pro Ser Met Thr Tyr Lys

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 9

Tyr Ser Ala Val Ser Gly Gly Ala Ser Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 10

Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala Leu Gln Ala Gly Cys

1 5 10 15

Lys

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 11

Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Ala Ser Asp Cys Ser Ser Leu Pro Ser Ala

1

5

10

15

Leu Gln

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> *Rhizopus oryzae* CP96001

<400> 12

Arg Phe Asn Trp Phe Lys

1

5

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

aa(ag)aa(ct)tgga(ct)ggxcc(agct)ac

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

tt(ag)aacca(ag)tt(ag)aa(agtc)cg

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

tt(ag)aacca(ag)tt(ag)aa(ct)ct

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

caatgtcttc cctctggaag cag

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

tgcccttagt gacagcaatg ccc

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

cttccttccg cactccaagc tgg

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ccagcttgga gtgcggaagg aag

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

tcactaaggg cagtgacacc atc

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

cagaggggaag acattgagag tag

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

acaacattat ttcttcaaac atg

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

aaatgccgca tcaagtttta ttg

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

ttcacttcta cctctgttgc tgg

<210> 25

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

gtaataaact tcatagatct atgtaaaaag aatg

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

ggatgagtat aaaagatctt attttcttga ac

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

cactttcaga agctttattg ccac

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

gagctagagc cagagttaga ag

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

gagaactgac atcggcctta cc

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

acaacatta tttcttcgaat atg

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

tttagcagc agaggccattt cag

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

ttttctatc ctgatacagag atg

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

gcgctcata aaacgactact acc

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

tgcccttag tgacagcaatg tcc

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

caagaaaat aagatctttta tactcctact

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

aacggcaat aaggcctctga atgtagc

<210> 37

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

gaaagcaat ggccagaaaac ttctgaaag

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

gcttcaaac tctctagactc tagcggc

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

cggttaaggc cgacgtcagtt ctcc

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 40

tacaggagc caacaggggag gtg

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 41

ttcacagca ggtaggtccat tcc

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 42

cctacggtt tcgccgctgct tcc

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 43

tagatacca acaccaccacc ggg

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 44

tgaagttcc ttaccattgcc tcc

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 45

tggtgaaac cactcgctact ggg

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 46

ttctgcctc tgactgttcta acc

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 47

aatagagtt actctatacga tag

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 48

caccaccag agacagcggag tag

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 49

tgcggtgat tatcctgacaa tcc

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 50

gcggatcca tgaagttcctt accattgcc

<210> 51

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 51

gcggatcct tat ttttcttga acagccaga

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 52

gtggaggtg agatcttcatt gggaac

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 53

cagcggagt actttgtagaa gcag

【図面の簡単な説明】

【図1】

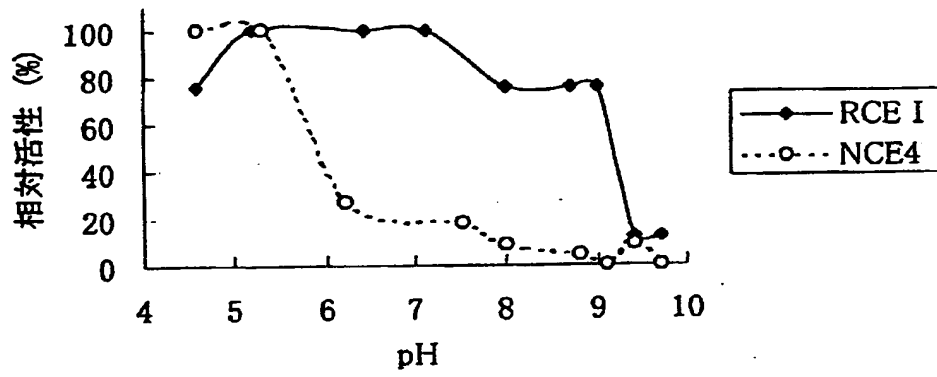
エンドグルカナーゼRCE I とNCE4のテンセルに対する反応pHと相対活性との関係を示すグラフである。

【図2】

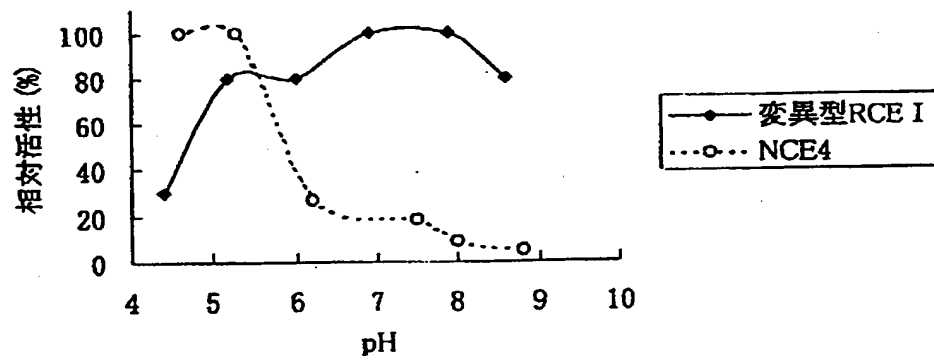
変異型エンドグルカナーゼRCE I とNCE4のテンセルに対する反応pHと相対活性との関係を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 セルロース含有繊維毛羽除去、減量加工、色の澄明化または局所的な変化を提供する加工処理に好ましく用いられる高活性セルラーゼおよびその遺伝子の提供。

【解決手段】 リゾプス・オリゼー（*Rhizopus oryzae*）由来の高活性エンドグルカナーゼRCEI、RCEII、またはRCEIIIを含んでなるセルラーゼ調製物は、少ない量でセルロース含有繊維の処理加工を可能にすることができる。特に、テンセルの毛羽除去加工に好ましく用いられ、また、アルカリ条件下での加工も可能となる。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000006091

【住所又は居所】

東京都中央区京橋 2 丁目 4 番 16 号

【氏名又は名称】

明治製菓株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100064285

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内 3-2-3 富士ビル 協和
特許法律事務所内

【氏名又は名称】

佐藤 一雄

【選任した代理人】

【識別番号】

100067079

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内 3-2-3 富士ビル 協和
特許法律事務所内

【氏名又は名称】

小野寺 捷洋

【選任した代理人】

【識別番号】

100094640

【住所又は居所】

東京都千代田区丸の内 3-2-3 富士ビル 協和
特許法律事務所

【氏名又は名称】

紺野 昭男

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006091]

1. 変更年月日 1990年 8月 3日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区京橋2丁目4番16号
氏 名 明治製菓株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)